

Antibiotikaresistens hos *E. coli* isolater fra ville dyr

Av Jannice Schau Slettemeås, bioingeniør, Cand. Scient. og overingeniør, seksjon for bakteriologi, Veterinærinstituttet og Marianne Sunde, forsker, seksjon for bakteriologi, Veterinærinstituttet. Artikkelen er basert på Slettemeås' Cand. Scient. grad i cellebiologi for medisinsk teknisk personell ved Norges teknisk- og naturvitenskapelige universitet. E-post: jannice.schau-slettemeas@vetinst.no

Sammendrag

Denne studien viste at ville dyr også kan ha antibiotikaresistente bakterier i sin mikrobielle tarmflora, dette til tross for at dyr i naturen aldri behandles med antimikrobielle midler. Resistensgener funnet hos bakteriene tilsvarte resistensgener som er vanlig forekommende hos human- og dyrepatogene bakterier, men organiseringen av resistensgenene var noe annerledes. Det er grunn til å anta at antibiotikaresistens er en "naturlig egenskap" hos enkelte sjeldne *Escherichia coli* stammer – og at det ikke utelukkende er en konsekvens av menneskelig bruk av antimikrobielle midler.

Nøkkelord: Antibiotikaresistens, ville dyr, *Escherichia coli*, overførbare genetiske elementer, resistensplasmider, integroner, transposoner

Abstract

This study indicates that wild-living animals can harbour antibiotic resistant bacteria in their microbial intestinal flora, even if they have not been exposed to selection pressure from the usage of antimicrobial agents. Resistance genes found in the bacteria correspond to resistance genes which normally occur in human and animal pathogenic bacteria, but the organization of the resistance genes was different. There is reason to assume that antibiotic resistance is a "natural ability" in some rare *Escherichia coli* strains – and that this is not solely a consequence of human use of antimicrobial agents.

Bakgrunn

Flere studier antyder at resistensgener stammer fra jordbakterier som produserer antimikrobielle midler eller deler samme miljø som disse produsentene (1, 2). Disse genene har sannsynligvis utviklet seg for å beskytte produsentene mot selvødeleggelse. Det er spekulert i om resistensgener på en eller annen måte har sluppet unna jordbakteriene, og at de etter DNA rekombinasjoner og horisontal overføring er blitt tatt opp av bakterier som har direkte kontakt med mennesker og dyr (2). Bruken av industrielt fremstilte antimikrobielle midler har trolig bidratt sterkt til denne prosessen.

Resistensgener er ofte lokalisert på ekstrakromosomale, selv-replikerende genetiske elementer kalt plasmider eller konjugative elementer kalt transposoner. Resistensplasmider har blitt identifisert i et bredt spekter av bakterier. Multiresistens plasmider er ofte et resultat av rekombinasjoner i plasmidet, integrering av transposoner og/eller integrering av genkassetter i integroner. Alle resistensgenene som er lokalisert på et multiresistens plasmid overføres hvis plasmidet beveger seg over til en annen vert. Dette er mulig dersom plasmidet er et konjugativt plasmid.

Transposoner er overførbare genetiske elementer, også kalt "hoppegener", som kan overføres fra et område i genomet til et annet ved en prosess som kalles transposisjon. Genene involvert i transposisjonene kalles transposaser (*tnp*) og er en del av transposonet (3). *tnpA* og *tnpR* er eksempler på gener involvert i transposisjonen.

Integroner er immobile genetiske elementer i seg selv, men kan overføres med plasmider og transposoner. Det mest utbredte integronet er klasse 1 integron som består av to konserverte segmenter; 5'- og 3' konserverte segment, og mellom dem et variabelt område der genkassetene er lokalisert. Det konserverte 5' segmentet oppstrøms for det variable området, inneholder et integrasegen, *intl*, som er vist å katalysere setespesifikk rekombinasjon (4). Genkassetene er små mobile strukturer på ca 250-1500 bp, ofte antibiotikaresistensgener, og det er i dag beskrevet mange ulike genkassetter (4, 5).

Mange streptomycinresistensgener er beskrevet fra kliniske bakterieisolater (6, 7). Det integronassosierte *aadA* genet koder for en 3'(9)-O-adenylyltransferase og finnes blant annet på overførbare elementer som Tn7 og Tn21 (7). Et av de mest utbredte streptomycinresistensgenene blant Gram-negative bakterier, er de koblede resistensgenene *strA-strB*. Disse genene koder for to enzymer; aminoglykosid 3"-fosfotransferase og aminoglykosid 6"-fosfotransferase, som modifierer streptomycin (6). *strA-strB* genene medfører streptomycinresistens hos bakterier fra

mennesker, dyr, planter og jord (7).

Hos menneske- og dyreassosierte bakterier (*E. coli*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Bordetella*) finner man ofte *strA-strB* genene på små ikke-konjugative "broad-host-range" plasmider som RSF1010 der de ofte er koblet med sulfonamidresistensgenet *sul2*. I jord- og plantebakterier, for eksempel *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Erwinia amylovora* med flere (7), forekommer *strA-strB* genene som regel som en del av transposon Tn5393, som er lokalisert på store konjugative plasmider eller på kromosomet (7, 8, 9). *strA-strB* genene er også funnet i fiskebakterien *Aeromonas salmonicida* (10).

Det er tre kjente sulfonamid resistensgener som koder for antibiotikaresistent dihydropteroat syntase; *sul1*, *sul2* og *sul3* (11, 12, 13, 14). *sul1* er som oftest lokalisert på 3' konservert segment hos klasse 1 integroner (11, 14), mens *sul2* vanligvis er lokalisert på små plasmider fra IncQ inkompatibilitetsgruppen som for eksempel RSF1010 (11). Sulfonamidresistens i Gram-negative bakterier er i hovedsak sett i forbindelse med plasmider, men kromosomale mutasjoner er også kjent (11).

Det er kjent minst 20 trimetoprimresistensgener (*dfr*), hvorav de fleste er genkassetter i integroner (15). Det mest utbredte DHFR genet blant Gram-negative bakterier er *dfrA1*, som ser ut til å spres blant annet med transposon Tn7 (14). Hos trimetoprimresistente kliniske bakterieisolater er Tn7 som regel lokalisert på kromosomet.

Det er kjent 38 forskjellige tetrasyklin, *tet* gener, og oxytetrasyklin, *otr* gener (16). Tetrasyklindeterminantene Tet A og Tet B er efflux proteiner og vanligvis assosiert med store, konjugative plasmider (17). Av de 23 efflux proteinene er 21 funnet kun hos Gram-negative bakterier (18). *tet* efflux gener hos Gram-negative bakterier finnes vanligvis på transposoner (17).

Hensikten med prosjektet var å undersøke om antibiotikaresistente *E. coli* kunne forekomme i avføringen fra ville dyr, samt å karakterisere eventuelle resistensgener for å kunne vurdere graden av slektskap med tilsvarende gener funnet i patogene bakterier hos mennesker, dyr, planter og i jord.

Materialer og metoder

Bakteriestammer

Totalt ble 139 *E. coli* isolater fra tarmfloraen hos ville dyr undersøkt i denne studien. Av disse inngikk 137 *E. coli* isolater i Helseovervåkningsprogrammet for hjortevilt (HOP) i årene 2001-2003 (19). Resultatene fra HOP-studien, deriblant resistensresultatene, er publisert i Acta veterinaria Scandinavica 2005 av Lillehaug et al. (19). I tillegg ble det inkludert to streptomycinresistente stammer (fra bjørn og elg) isolert i forbindelse med andre studier (20). Resistensbestemmelse av *E. coli* isolatene ble utført med mikrobuljongdilusjonsmetoden VetMICTM (Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Uppsala, Sverige) etter leverandørens anbefalinger. Den antimikrobielle aktiviteten ble målt ved å bestemme "minimum inhibitory concentration" (MIC); den laveste konsentrasjonen av et antimikrobielt middel som skal til for å hemme veksten av en mikroorganisme. Videre ble konjugeringsforsøk utført for å undersøke resistensgenenes mobilitet.

DNA-teknikker

Total DNA ble isolert ved hjelp av en kokemetode eller ved bruk av Easy-DNATM Kit Version E (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA). Det ble benyttet fire metoder for å isolere plasmider. En småskalametode beskrevet av Birnboim og Doly (21), en storskalametode beskrevet av Kado og Liu (22), samt to kommersielt tilgjengelige metoder fra QIAGEN® (Venlo, Nederland); QIAprep® spin miniprep kit og QIAGEN® Plasmid Purification Using Maxi Kits.

Mange resistensgener hos *E. coli* og andre Gram-negative bakterier er karakterisert og beskrevet og det ble benyttet primere fra kjente sekvenser for å kartlegge relevante resistensgener. PCR ble utført for å detektere resistensgenene *sul1*, *sul2*, *strA-strB*, *aadA1*, transposonene Tn1721 og Tn5393, integron klasse 1 og tetrasyklinresistensgenene *tetA* og *tetB*.

Hybridiseringanalyser ble benyttet for å påvise tilstedeværelsen av et gen og for å studere hvordan genene var organisert i

Ordforklaringer

Overførbare genetiske elementer: Overførbare DNA molekyler som er involvert i spredning av gener. Transposoner og plasmider er eksempler på slike elementer.

Plasmider: Små, ofte sirkulære DNA molekyler som replikeres uavhengig av vertscellen. Finnes ofte i tillegg til bakterienes kromosom.

Resistensplasmider: Plasmider som inneholder gener for antibiotikaresistens.

Fitness-plasmider: Plasmider som forkorter generasjonstiden til den bakterien det er en del av. Plasmider som forbedrer vertens egnethet/fitness.

Broad-host-range plasmider: Bredspektrede plasmider som kan introduseres i flere typer bakterier.

Transposoner: Genetisk element som kan overføres fra et område

i genomet til et annet ved en prosess som kalles transposisjon. Slike elementer bærer ofte antibiotikaresistensgener i tillegg til genene som er involvert i transposisjonen.

Integroner: Immobilt genetisk element som kan overføres med plasmider og transposoner mellom bakterier. Inneholder to konserverte segmenter (områder) i tillegg til det variable området der genkassetter kan integreres.

Genkassetter: Små, sirkulære mobile elementer (ofte antibiotikaresistensgener) som kan fjernes fra eller integreres i integroner.

Ekstrakromosale: Elementer som ikke sitter på kromosomet.

Selvreplikerende: Elementer som replikeres uavhengig av vertscellen det er en del av. Konjugative.

Enteriske bakterier: Bakterier som finnes i tarmen.

Tabell 1. Oversikt over karakteristikk hos *E. coli* isolatene med resistensprofil, resistensgener og overførbarhet.

Stamme	Dyreart	Opprinnelse	Resistensprofil (MIC mg/L)	Resistensgen	Overførbarhet (plasmidstørrelse)
662	Rådyr	Ringsaker kommune, Hedmark	TET (> 64)	Tet B	–
899	Rådyr	Vestby kommune, Akershus	SM (16) SUL (>512) TET (>16) TET (>64)	Tet A Integron kl 1: <i>aadA1</i> <i>sul1</i> <i>dfrA1</i>	– SM + SUL + TM (>100 kb) + TET
678	Hjort	Gaular kommune, Sogn og Fjordane	SM (64) SUL (>512)	<i>strA-strB</i> <i>sul2</i>	– (6,2 kb)
W9608	Brunbjørn	Dalarna län, Sverige	SM (256)	<i>strA-strB</i> på Tn5393	+ (~200 kb)
E1092	Elg	Vega kommune,	SM (128)	<i>strA-strB</i>	+ (~200 kb)

TET – oxytetrasyklin, SM – streptomycin, SUL – sulfonamider, TM – trimetoprim

genomet. Det ble benyttet prober merket *in vitro* med [α - 32 P]dCTP (Montebello Diagnostics, Oslo, Norge/Hartmann analytic, Braunschweig, Tyskland).

Sekvenseringsanalyser ble utført for å kartlegge slektskap mellom resistensgener hos *E. coli* fra ville dyr med tilsvarende genetiske strukturer hos isolater fra patogene bakterier fra mennesker, dyr og planter.

Resultater og diskusjon

Antibiotikaresistens hos ville dyr

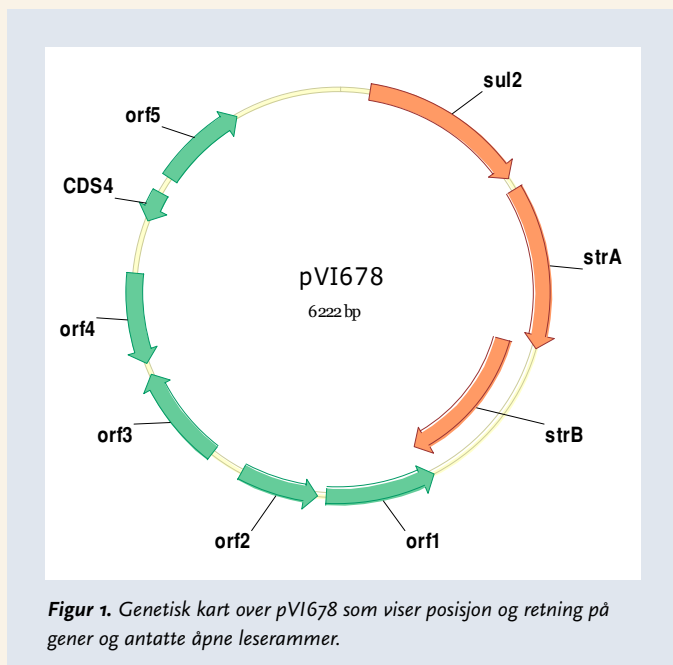
Vi fant i vår studie ut at kun tre av de 137 *E. coli* isolatene (2,2 %) fra HOP-studien som vi undersøkte, var resistente. Stamme 899 (rådyr) var resistent overfor fire antimikrobielle midler, stamme 678 (hjort) overfor to og stamme 662 (rådyr) overfor ett antimikrobielt middel. W9608 (bjørn) og E1092 (elg), fra andre studier, viste seg å være resistente overfor kun streptomycin. Se

tabell 1 for oversikt over resultatene.

Andelen av resistente isolater i denne studien var vesentlig lavere enn for *E. coli* isolert fra avføringsprøver hos storfe og svin i Norge. Slike bakterier er blitt testet via overvåkningsprogrammet for antibiotikaresistens i Norge NORM/NORM-VET (www.vetinst.no).

Ved seksjon for Vilthelse ved Veterinærinstituttet i Oslo ble det i regi av HOP også samlet inn avføringsprøver fra villrein i jaktseasonen 2003 (19). Det ble isolert 42 *E. coli* isolater fra 50 avføringsprøver fra forskjellige dyr. Ved sammenlikning med isolatene fra elg, hjort og rådyr, var andelen av resistente isolater fra reinsdyr høyt, hele 24 % ($n = 10$), hvorav tre var multiresistente. Streptomycinresistens var mest utbredt blant reinsdyrisolatene og det ble videre spekulert i om disse dyrene eksponeres for antimikrobielle midler eller liknende substanser i forbindelse med næringsinntaket (19).

I en fransk undersøkelse ble 341 *E. coli* isolater fra ulike dyrepopulasjoner undersøkt (23). Disse dyrepopulasjonene hadde ulik grad av kontakt med human sivilisasjon. Det var 18 isolater fra ville dyr fra Antarktis eller Gabon som aldri hadde hatt kontakt med mennesker, 71 fra et område med lav befolkningstetthet (fjellområder i Pyreneene, Frankrike), 61 var ville dyr fra områder med høyere befolkningstetthet (Fontainebleau-skogen i nærheten av Paris, Frankrike), mens 128 var gårdsdyr og 42 var kjæledyr fra Pyreneene i Frankrike (23). Undersøkelsen viste at isolatene fra dyr som levde lengst vekk fra human sivilisasjon var helt fri for antibiotikaresistens. I området med lav befolkningstetthet var 17 % av isolatene resistente mot minst et antimikrobielt middel, og fra områder med høyere befolkningstetthet var 49 % av isolatene resistente. Skurnik et al. (23) fant en kobling mellom tilstedeværelsen av integroner og eksponering overfor human sivilisasjon. Klasse 1 integroner ble kun funnet i *E. coli* isolater fra dyr som var i nær kontakt med mennesker; gårdsdyr (7 %) og kjæledyr (16 %). Alle integronene fra gårdsdyr var svært like og bar samme genkasset; *aadA1*, alene eller



sammen med *dfrA1* eller *sat1*. Integronene fra kjæledyr viste samme fordeling av genkassetter som ble funnet i normalfloraen hos mennesker i en annen studie av Skurnik et al. (24). I den studien ble det vist at integroner kan persistere i *E. coli* i den humane normalfloraen uten antimikrobielt seleksjonspress. Skurnik et al. (23) foreslo at integronene var til stede på grunn av en ervervet prosess til miljøet rundt, der et antimikrobielt seleksjonspress har overgått en viss terskel. Disse beskrevne funnene viser at tarmbakterier fra populasjoner av ville dyr som lever nær mennesker bærer en høyere frekvens av antibiotikaresistensgener enn populasjoner som har liten eller ingen kontakt med det menneskelige miljøet.

I vår studie ble det funnet antibiotikaresistente *E. coli*-isolater fra ville dyr med ulik grad av kontakt med human sivilisasjon i fem isolater. Vi gikk videre med tre av disse isolatene. De blir nå nærmere beskrevet.

Antibiotikaresistent E. coli fra hjort, Gaular kommune, Sogn og Fjordane (stamme 678)

Stamme 678 var resistent mot streptomycin og sulfonamider, og inneholdt resistensgenene *sul2* (MIC 128 mg/L) og *strA-strB* (MIC > 64 mg/L). Resistensgenene var lokalisert ved siden av hverandre på et lite, ikke-overførbart plasmid, se figur 1. Sekvensen er tilgjengelig i GenBank EF090911.

Plasmidet i stamme 678 var på 6222 bp og nukleotidsekvensen var 99,9 % identisk med plasmid p9123 beskrevet og karakterisert av Enne et al. (25). Plasmidet p9123 ble funnet i et klinisk *E. coli* isolat fra London. Det var tre mutasjoner i posisjon 674 (leseramme *sul2*), 2930 og 3151 (begge i leserammen til *orf1*) sammenliknet med p9123. Kun den siste mutasjonen førte til endring av aminosyre fra asparaginsyre til glysin.

p9123 er et "fitness-plasmid" som forkorter generasjonstiden til den bakterien det er en del av (25). Både dette og liknende plasmider er meget utbredt blant enteriske bakterier, sannsynligvis på grunn av denne egenskapen. Funn av det samme plasmidet i tarmfloraen hos ville dyr viser at resistensplasmidet opprettholdes uten seleksjonspress fra antibiotikabruk.

Antibiotikaresistent E. coli fra brunbjørn, Dalarna län, Sverige (stamme W9608)

Stamme W9608 inneholdt streptomycinresistensgenene *strA-strB* lokalisert på transposonet Tn5393. Tn5393 var lokalisert på et stort (ca 200 kb) overførbart plasmid, totalt 9712 bp av plasmidet ble sekvensert. Sekvensen er tilgjengelig i GenBank EF108308. Tn5393 i stamme W9608 inneholdt et trunkert *tnpR* gen, et trunkert IS1133 element (IS – insertion sequence) og rester av "inverted repeat" sekvenser fra transposonet Tn10. BLASTN søk viste at dette området var mest beslektet med et område på et *Salmonella* Typhimurium plasmid (AP005147). Dette plasmidet har et transposon Tn10 innsatt i IS1133 elementet på et Tn5393 transposon, se figur 2 på neste side. Denne stammen inneholder plasmidet pR64, som er et stort plasmid

(120 kb) som tilhører IncI1 inkompatibilitetsgruppen.

Dette er første gang et Tn5393 er funnet hos *E. coli* fra pattedyr. Tn5393 er et 6,7 kb langt transposon som er i stand til å erverve IS elementer for å øke ekspresjonen av streptomycinresistens i ulike slekter av bakterier (26).

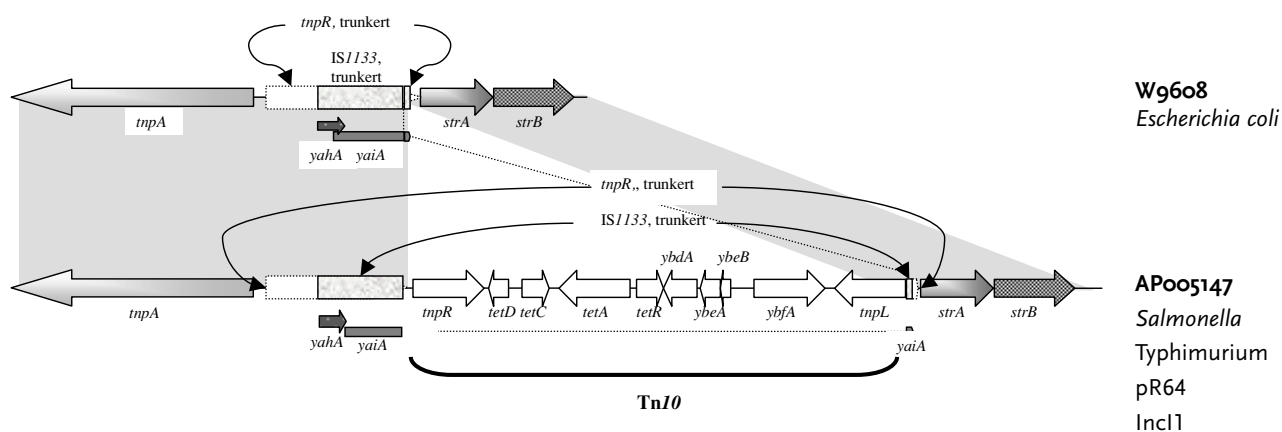
Området nedstrøms og oppstrøms for IS1133 hos *S. Typhimurium* (AP005147) og W9608 (*E. coli*) ble sammenliknet og viste tilnærmet 100 % homologi for disse stammene. Dette kan indikere at IS1133 elementet har blitt satt inn i *tnpR* og at transposonet Tn10, et klasse I transposon, har vært tilstede i W9608 for så å bli deletert vekk fra plasmidet og etterlate seg flankerende områder som fortsatt finnes i stammen.

Det finnes ikke bevis på nylig overføring av *strA-strB* genene mellom menneske-/dyreassosierte og planteassosierte bakteriegrupper, men det finnes sterke indikasjoner for at *strA-strB* genene som finnes på små ikke-konjugative sulfonamid- og streptomycinresistente plasmider opprinnelig var linket til Tn5393 sekvensen (7). Dette transposonet kan ha utviklet seg i en jordbakterie som et resultat av naturlig streptomycinseleksjon fra streptomycinproduserende bakterier (7). Oppdagelsen av Tn5393 sekvenser i flere bakterier fra ulike geografiske områder indikerer at dette transposonet er del av en "pool" av gener som er tilgjengelig for et bredt spekter av organismer (26). Streptomycin brukes lite til behandling av infeksjoner i humanmedisinen i dag, slik at persistensen av *strA-strB* i kliniske bakteriepopulasjoner tyder på at andre faktorer enn direkte antimikrobiell seleksjon kan være involvert i vedlikeholdet av disse genene (26).

Antibiotikaresistent E. coli fra rådyr, Vestby kommune, Akershus (stamme 899)

Stamme 899 inneholdt et integron klasse 1 med genkassetene *sul1*, *dfrA1* og *aadA1* som medførte resistens mot sulfonamider, trimetoprim og streptomycin. *aadA1* ble uttrykt lavgradig på grunn av svak promoter. I tillegg inneholdt stammen tetrasyklinresistensgenet *tetA* lokalisert på et trunkert transposon Tn1721. Disse områdene var lokalisert på et stort (ca 200 kb) overførbart plasmid.

Det var ingen nukleotidsekvenser ved BLASTN søk som hadde nøyaktig samme organisering av klasse 1 integronet og flankerende DNA, men det var meget stor grad av homologi mellom området oppstrøms for *tetA(A)* og flere publiserte sekvenser. Området nedstrøms for *tetR(A)* ble sekvensert og et *oriV*, som er et incP vegetative "origin of replication", ble påvist 353 bp nedstrøms for *tetR(A)*. Sekvensen til området oppstrøms for *tetA(A)* var blant annet 100 % homologt med et område på IncP-1a plasmid; pTB11 (AJ744860) og plasmid pRSB101 (AJ698352), begge isolert fra rensanlegg for avløpsvann, og plasmid pKBB958 (AM183165) isolert fra *Bordetella bronchiseptica* fra svin. Tennstedt et al. (27) viste at bakterier med IncP-1 plasmider frigjøres i miljøet med avløpsvannet fra slike rensanlegg. Tetrasyklinresistensområdet på plasmidet pTB11 er nesten



Figur 2. Sammenlikning av *Salmonella* Typhimurium (AP005147) og W9608 (*Escherichia coli*). W9608 inneholder et trunkert *tnpR* gen, et trunkert IS1133 element og rester av "inverted repeat" sekvenser fra transposonet Tn10. *S. Typhimurium* har et transposon Tn 10 innsatt i IS1133 elementet på et Tn5393 transposon. Området nedstrøms og oppstrøms for IS1133 hos *S. Typhimurium* og W9608 viste tilnærmet 100 % homologi for disse stammene.

identisk med en indre del av Tn1721 og det er sannsynlig at dette DNA-området representerer den sentrale kjernen av Tn1721 (27).

Avslutning

De tre *E. coli* isolatene som ble valgt ut for videre genetiske studier viste seg å ha forskjellig organisering av resistensgenene. Stamme 678 hadde *strA-strB* og *sul2* genene lokalisert ved siden av hverandre på et lite ikke-overførbart plasmid. Stamme W9608 inneholdt et stort overførbart plasmid der *strA-strB* genene var lokalisert på transposon Tn5393 som inneholdt IS elementet IS1133. Stamme 899 inneholdt et klasse 1 integron med genkassetene *dfrA1*, *aadA1* og *sul1*. I tillegg inneholdt stammen tetrasyklinresistensdeterminanten Tet A som var del av et trunkert transposon Tn1721. Disse resistensgenene var lokalisert på et stort overførbart plasmid.

Skurnik et al. (23) fant at klasse 1 integroner kun ble detektert i *E. coli* isolater isolert fra avføringen hos dyr som hadde vært i nær kontakt med mennesker eller menneskelig aktivitet. *E. coli* isolatet fra stamme 899, med klasse 1 integron, ble isolert fra et rådyr i Vestby kommune i Akershus fylke. Dette området ligger cirka fire mil utenfor Oslo og er relativt tett befolket. Det er imidlertid også vist at klasse 1 integroner kan forekomme i miljøer langt fra mennesker hvor antimikrobielle midler aldri brukes (23, 28). Det er blant annet vist at et *E. coli* isolat fra avføringen fra et reinsdyr som levde i et fjellområde i midt-Norge (Forelhogna, 900-1200 moh), inneholdt et klasse 1 integron med genkassetten *aadA1* og et intron klasse II (28). Dette kan indikere at klasse 1 integroner er mer vanlig i naturen enn man først trodde, og at de trolig har eksistert siden før antimikrobielle midler ble framstilt industrielt og tatt i bruk for å behandle infeksjonssykdommer (28).

I de to andre stammene (678 og W9608) ble *E. coli* isolert fra avføringen hos dyr som har oppholdt seg i lite befolkete områder, blant annet Gaular kommune i Sogn og Fjordane (678) og Dalarna län i Sverige (W9608). I disse to stammene ble *strA-strB* genene funnet og det kan indikere at resistensgenene kan ha blitt overført fra streptomycinproduserende bakterier i jorda.

Likhetstrekk mellom resistensgener og organiseringen av dem er funnet mellom enterobakterier og plante- og jordbakterier. IncP-1a plasmider bidrar til "poolen" av horisontalt overførbare genetiske elementer som er assosiert med kloakkbakterier. Flere hot-spots for horisontal genoverføring av genetisk materiale er oppdaget i miljøet. Blant disse er renseanlegg for avløpsvann spesielt viktige siden de mottar spillvann/kloakk som inneholder vesentlige mengder antimikrobielle midler og resistente bakterier fra sykehus, privat hushold, industri og landbruk (27, 29).

Denne studien har vist at villlevende dyr, som ikke har vært behandlet med antimikrobielle midler, også kan ha antibiotikaresistente bakterier i sin mikrobielle tarmflora. Resistensgener funnet hos disse bakteriene tilsvarer resistensgener som er vanlig forekommende hos human- og dyrepatoogene bakterier. Organiseringen av resistensgenene hos bakterier fra ville dyr er noe annerledes enn hos human- og dyrepatoogene bakterier. Det er grunn til å anta at antibiotikaresistens er en "naturlig egenkap" hos enkelte sjeldne *E. coli* stammer – og at det ikke utelukkende er en konsekvens av menneskelig bruk av antimikrobielle midler.

Litteratur

1. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 1994; 264 (5157): 375-382
2. Levy SB. 1992. *The Antibiotic Paradox. How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle*. Plenum Press of Plenum Publishing Corporation.
3. Snyder L, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria*, Second ed. ASM Press. 2003.
4. Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 1995; 141 (Pt 12): 3015-3027
5. Sunde M. Antibiotic resistance in bacterial normal flora. Studies involving epidermal staphylococcal species and intestinal *Escherichia coli*. Doctor Medicinae Veterinariae. Institutt for farmakologi, mikrobiologi og næringsmiddelhygiene: Norges veterinærhøgskole; 2001.
6. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, 1993; 57 (1): 138-163
7. Sundin GW, Bender CL. Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Mol Ecol*, 1996; 5 (1): 133-143
8. Sundin GW, Monks DE, Bender CL. Distribution of the streptomycin-resistance transposon Tn5393 among phylloplane and soil bacteria from managed agricultural habitats. *Can J Microbiol*, 1995; 41 (9): 792-799
9. Sundin GW. Examination of base pair variants of the strA-strB streptomycin resistance genes from bacterial pathogens of humans, animals and plants. *J Antimicrob Chemother*, 2000; 46 (5): 848-849
10. L'Abée-Lund TM, Sørum H. Functional Tn5393-like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66 (12): 5533-5535
11. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39 (2): 279-289
12. Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47 (3): 1169-1172
13. Rådström P, Swedberg G. RSF1010 and a conjugative plasmid contain sullI, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988; 32 (11): 1684-1692
14. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*, 2001; 32 (3-4): 261-273
15. White PA, Rawlinson WD. Current status of the aadA and dfr gene cassette families. *J Antimicrob Chemother*, 2001; 47 (4): 495-496
16. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 2005; 245 (2): 195-203
17. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001; 65 (2): 232-260
18. Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis*, 2003; 36 (4): 462-467
19. Lillehaug A, Bergsjø B, Schau J, Bruheim T, Vikøren T, Handeland K. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Vet. Scand*, 2005; 46 (1-2): 23-32
20. Wasteson Y, Arnemo JM, Johansen BK, Vold L, Mathiesen SD, Olsen MA, Wiig O, Derocher AE. Analysis of faecal samples from wild animals for verocytotoxin producing *Escherichia coli* and *E coli* O157. *Vet Rec*, 1999; 144 (23): 646-647
21. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979; 7 (6): 1513-1523
22. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*, 1981; 145 (3): 1365-1373
23. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57 (6): 1215-1219
24. Skurnik D, Le Menac'h A, Zurakowski D, Mazel D, Courvalin P, Denamur E, Andremont A, Ruimy R. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49 (7): 3062-3065
25. Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J Antimicrob Chemother*, 2004; 53: 958-963
26. Sundin GW, Bender CL. Expression of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Appl Environ Microbiol*, 1995; 61 (8): 2891-2897
27. Tennstedt T, Szczepanowski R, Krahn I, Puhler A, Schluter A. Sequence of the 68,869 bp IncP-1alpha plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid*, 2005; 53 (3): 218-238
28. Sunde M. Class I integron with a group II intron detected in an *Escherichia coli* strain from a free-range reindeer. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49 (6): 2512-2514
29. Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, Goesmann A, Puhler A, Schluter A. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology*, 2004; 150 (Pt 11): 3613-3630

Fagartiklene i Bioingeniøren er fagfelleverderte

Bioingeniøren praktiserer fagfellevurdering av fagartiklene. Det vil si at alle fagartikler som kommer på trykk under vignetten FAG er vurdert av referee. De som deltar i Bioingeniørens refereordning må oppfylle følgende krav: Minimum mastergradskompetanse, har/har hatt selvstendig rolle i forskningsarbeid, relevant yrkeserfaring i forhold til den aktuelle artikkelen, publisert i fagvitenskapelige tidsskrift.

Vi ønsker å knytte til oss flere referee. Skriv en epost til biored@nito.no hvis du fyller kravene eller kjenner andre som gjør det.